



PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 C12N 5/06, 5/10, 15/12, G01N 33/48, A61K 35/30, 48/00		A1	(11) 国際公開番号 WO98/39415
			(43) 国際公開日 1998年9月11日(11.09.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00949		(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (CH, DE, FR, GB, IT), 添付公開番号 国際調査報告書 明細書とは別に、規則 13 の 2 に基づいて提出された微生物 の名前に関する表示 国際特許局による受理の日付：1998年03月20日(20.03.98)	
(22) 国際出願日 1998年3月5日(05.03.98)			
(30) 優先権データ 特願平9/50448 1997年3月5日(05.03.97) JP			
(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama, (JP)			
(72) 発明者：および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 澤田 駿(SAWADA, Mukoto)[JP/JP] 〒487-0015 愛知県春日井市気噴町北二丁目21番 Aichi, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 佐伯鑑生(SAEKI, Norio) 〒110-0016 東京都台東区台東一丁目30番9号 第2ツツヤビル9階 Tokyo, (JP)			

(54) Title: ESTABLISHED MICROGLIA

(54) 発明の名称 株化ミクログリア

(57) Abstract

A subcultivable, established microglia having the following properties. (a) Form: Both or either of a macrophage-like or spherical form in the presence of a granulocyte-macrophage colony stimulation factor and a branched form similar to branched microglia present in the brain in the absence of the factor. (b) Functional characteristics: specific affinity for the brain. Highly poor phagocytic action. (c) Cell proliferation: proliferative depending upon a granulocyte-macrophage colony stimulation factor. Preparation, separation, and screening methods of the microglia, a pharmaceutical composition using the microglia, and a method for treatment of cerebral diseases using the composition.

(57) 要約

本発明は以下の性質を有する継代培養可能な株化ミクログリアに関する。

(a) 形態：顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子存在下においてマクロファージ様又は球状の形態、及び該因子非存在下において脳内に存在する分枝状ミクログリアに類似した分枝状の形態の両者又はいずれか一方の形態を有する。

(b) 機能的特徴：脳に特異的親和性を有する。

強い貪飢能を有する。

(c) 細胞増殖性：顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子に依存的に増殖する。

さらに、該ミクログリアを製造、分離、スクリーニングする方法、及び、該ミクログリアを用いた医薬組成物、該組成物を用いた脳疾患治疗方法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を回すために使用されるコード（参考情報）

明細書

株化ミクログリア

技術分野

本発明は、継代培養の可能な株化ミクログリア、その分離方法、及び、その医薬用キャリアーとしての用途に関する。

さらに、本発明は、外来遺伝子又は薬物を導入したミクログリア、その導入法、及び、それを含有する医薬組成物に関する。

背景技術

神経系に関する遺伝性の疾患は非常に多く、単一の酵素が欠損するために発症するもの、あるいは未だに原因不明のものなど様々である。これらの疾患に対しては、多くは補充療法により対処されているのが現状である。

一方、脳への選択的物質移送システムについては、国内外で多数研究されており、動物個体レベルでの脳内への遺伝子導入については向神経性をもつたウイルスを用いたアデノウイルスベクター法が考案され、神経細胞特異的に遺伝子を導入できるシステムが知られている (Kozarsky, K.P. and Wilson, J.M., Curr. Opin. Genet. Dev. 3, 499-503, 1993)。また、レトロウイルスベクターを用いる方法も考案され、肝細胞や血液細胞などに導入することが成功している (Mulligan, R. C. Science 260, 926-932, 1993)。

しかしながら、脳には血液脳関門 (Blood Brain Barrier) が存在するため、補充療法を行ったり有効な薬物を導入することが困難であり、また、末梢から物質 (例えば抗癌剤やDNAなど) を投与しても脳に特異的に導入することができない。従って、従来は手術によって物質を脳に直接注入する以外に方法がなかった。

一方、手術などの侵襲的な手技を伴わない方法としてリポソームを利用する方法があり、リポソームの構成要素を変えることによって脳に比較的入りやすいものが国内のグループによって開発された。しかし、この方法でも脳への取り込みは注入量の1%程度で、脳に特異的であるとはいえない。

このように、脳には血液脳関門が存在するため、末梢からの物質や細胞の浸潤がほとんどなく、薬物や遺伝子導入が困難である。実際に正常脳ではT細胞やマクロファージなどの免疫細胞の浸潤はほとんどみられない。

ミクログリアは、マクロファージ様の性質を持つ中枢神経系細胞であり、炎症反応やウイルス感染において免疫担当細胞として働いたり、細胞を取り除く食食細胞として働くほか、中枢神経系サイトカインネットワークの中心的役割を果たす細胞である (Sawada, M. et al., *Int. J. Dev. Neurosci.*, 13, 253-264, 1995)。また、最近では学習や記憶といった高次の脳機能の発現にも不可欠であることが示され、脳に特異的な役割を持った特殊化した細胞であると考えられている。現在までのところミクログリアの起源は周産期に脳内に侵入した単球が特殊化して分化すると考えられていた。

また、ミクログリアは、脳細胞の一次培養により得ることができるが、一次培養をするためには使用する度に脳を摘出して精製する必要があり、しかも通常2週間前後の期間が必要とされるため、操作が煩雑である。また、培養下で増殖させることが困難であり、継代することができないことから、一次培養ミクログリアに遺伝子を導入し、それを発現させることは極めて困難である。

ところで、本発明者らは脳に特異的なマクロファージと考えられているミクログリアを研究する過程で高純度精製のミクログリアを得ることに成功しその性質を調べた結果、ミクログリアはマクロファージとは異なり脳に特異的な親和性をもつことを見い出した。

また、本発明者らは脳に対する親和性や浸潤できるか否かについてマクロファージとミクログリアが決定的に異なることを見い出した。さらに、両者を識別できる方法で染色してその分布を調べたところ、ミクログリアが発生の早い段階から脳内に存在することを見い出した。したがって、ミクログリアは骨髓で分化成熟する単球由来ではなく、脳に特異的な親和性を持った細胞群が発生の初期に脳内に侵入し、脳の形態形成や記憶学習といった高次機能まで調節するようになると考えられる。

そこで、本発明者らは単離したマクロファージとミクログリアをラット末梢動脈に注入して脳への選択的配向性があるかどうかについて比較した結果、蛍光色

素を用いて標識したミクログリアを注入した場合には脳には多くの蛍光細胞が見られたが、肝臓にはわずかしか見られなかつた。これに対しマクロファージを注入した場合には正常脳にはほとんど蛍光細胞が見られないが肝臓には多くの蛍光細胞が見られた。

つぎに、本発明者らが確立したミクログリアの細胞株に *lac Z* 発現ベクターを導入したものをラット血流中に注入して脳に選択的に遺伝子を発現させることができるとどうかを検討したところ、*lac Z* 発現細胞を注入したラット脳切片で β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase) の活性が検出できた。以上の結果からミクログリアはマクロファージとは異なり脳に特異的な親和性をもつた細胞であること、この親和性を利用すれば末梢血流中から特定物質や遺伝子を脳に特異的に導入できることがわかつた。

本発明の開示

すなわち、本発明は、継代培養が可能なミクログリア、詳細には、以下の性質を有する株化ミクログリアに関する。

- (a) 形態：顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子存在下においてマクロファージ様又は球状の形態、及び該因子非存在下において脳内に存在する分枝状ミクログリアに類似した分枝状の形態の两者又はいずれか一方の形態を有する。
- (b) 機能的特徴：脳に特異的親和性を有する。また、強い食食能を有する。
- (c) 細胞増殖性：顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子に依存的に増殖する。

また、本発明は、サイトカイン、好ましくはコロニー刺激因子 (CSF)、より好ましくは顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) の存在下に、好ましくはさらには IL-3 及び／又は精製アストロサイトの存在下に、ミクログリア細胞から継代培養が可能な株化ミクログリアを分離する方法に関する。

さらに、本発明は、前記ミクログリアからなる脳に特異的な親和性を有する医薬キャリアー（担体）に関する。

また、本発明は、遺伝子又は薬物が導入された前記株化ミクログリアに関する。

また、本発明は、遺伝子または薬物が導入された前記ミクログリア、及び、製

業上の担体とからなる医薬組成物、特に脳疾患治療剤である医薬組成物に関する。

さらに、本発明は、外来遺伝子、及び、蛍光蛋白質、好ましくはクラゲ由來の蛍光蛋白質を発現する遺伝子を用いて、ミクログリアに遺伝子を導入することがなる、外来遺伝子が導入されたミクログリアのスクリーニング方法及び製造方法に関する。本発明のこの方法におけるミクログリアとしては、従来のミクログリアを使用することもできるが、本発明の前記した株化ミクログリアを使用することが好ましい。

また、本発明は前記医薬組成物を用いて脳に特異的に薬物または遺伝子を送達させてなる脳疾患の治療方法に関する。

以下、本発明を詳細に説明する。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の株化ミクログリアの形態を示す写真（生物の形態）である。

第2図は、本発明の株化ミクログリアとマクロファージとの組織特異性の違いを示す写真である（生物の形態）。

第3図は、リボ多糖刺激によるサイトカインの発現を示す電気泳動写真である。

第4図は、本発明の株化ミクログリアのGM-CSF依存的増殖を示す図である。

第5図は、ラット脳内における遺伝子の発現を示す写真である（生物の形態）。

第6図は、ラット脳内における遺伝子の発現を示す図である。

第7図は、遺伝子が導入されていない細胞のFACS分析の結果を示す図である。

第8図は、GFP導入細胞のFACS分析の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の株化ミクログリアは、マウス又はラットの脳細胞を一次培養してミクログリアを精製し、さらにこの精製ミクログリアから、本発明の株化ミクログリアクローンを以下の手法により分離することができる。また、本発明の株化ミクログリアは取扱いが容易でしかも脳に親和性を有するため、株化ミクログリアに

遺伝子又は薬物を導入し、末梢血管に注入することにより脳内に特異的に遺伝子を発現させ、また薬物を送達させることができる。

本発明の株化ミクログリアの製造法をさらに詳細に説明する。

(1) ミクログリアの精製

まず、採取されたマウス又はラット脳の脳膜を剥離し、ピベット又はナイロンメッシュ等を用いて単細胞に分離する。マウス及びラットは新生のものが好ましい。マウスとしては、例えばC57BL6、C3H、ICR、Balb/c等が挙げられ、ラットとしては例えばフィッシャー(Fisher)、ウィスター(Wister)、SD等が挙げられるがこれらに限定されない。

得られた細胞を通常の動物細胞用培養培地(10%FCS、又はCSを含むEMEM等)にまき10~14日培養する。なお、3~4日毎に培地を交換する。

次に、得られた培養細胞から株化するための細胞を選別する。

ここで、ミクログリアにはタイプIとタイプIIと呼ばれるものがあり、タイプIは、一次培養物を機械的に刺激する(ピベットで培地を吹き付ける、培養皿を揺する等)ことによって培養皿から剥がれて浮遊する細胞である。一方、タイプIIは前記機械的刺激によっては浮遊しない細胞(付着細胞)である。本発明のミクログリアはタイプIIに属するものであるため、以下のようにして精製ミクログリアを選別することができる。

上記機械的刺激によって浮遊しない付着細胞をさらにトリプシン-EDTA処理して単細胞にした後、何ら処理されていないプラスチックディッシュ(ノンコートプラスチック皿という)に播いて付着させる。一般に、培養皿は正電荷を持つように薬物で処理されているが、付着細胞を得るにはその処理がされていないディッシュを使用する必要があるためである。37°Cで1時間CO₂インキュベーターで加温後、機械的刺激を与えて培地中に浮遊する細胞を取り除いた後、皿に接着したまま増殖できる細胞をラバーポリスマン等で回収し、同様の操作をさらに2回繰り返して得られる細胞を、株化のための精製ミクログリアとして得ることができる。以上のようにして得られた精製ミクログリアは、十分な純度を有するが、さらに精製純度を上げるため、セルソーター等を用いてもよい。

(2) 株化ミクログリアの分離

(1) のようにして得られた精製ミクログリアから、本発明の継代培養が可能な株化ミクログリアを分離するためには、前記精製ミクログリアをサイトカイン、好ましくはコロニー刺激因子 (CSF)、より好ましくは顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) の存在下に培養し、これをクローニング化して行うことができる。培養の際に存在させるサイトカインとしては、GM-CSF を単独で使用してもよいが、GM-CSF にさらに IL-3 及び／又は精製アストロサイト由来の上清を存在させてもよい。使用するサイトカインは、天然のものでも、遺伝子組み換え型のものであってもよい。より詳細には、例えば、次のようにして行うことができる。

10 cm 程度のシャーレに播いて遺伝子組換え型顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (r GM-CSF) 存在下で 7 ~ 10 日培養する。培養後細胞を回収し、r GM-CSF の存在下で、いわゆる限界希釀法によりさらに細胞を 4 ~ 10 週間培養する。そして、テストプレート 1 ウェルあたり 1 個のコロニーを形成した細胞をラバーポリスマンで遊離することによりクローニングしたものを選別、分離し、最終的に株化ミクログリアを得る。

このようにして得られた株化ミクログリアは以下の性質を有するものである。

(a) 形態

蛍光色素染色を行い蛍光顕微鏡下で、又は無染色のまま位相差顕微鏡下で形態を観察した結果、r GM-CSF の存在下においてマクロファージ様若しくは球状の形態、又は r GM-CSF の非存在下において脳内に存在する分枝状ミクログリアに類似した分枝状の形態を有する。あるいは上記の両形態を有する。

(b) 機能的特徴

本発明の株化ミクログリアをマウスの動脈に投与すると脳に特異的に移行することから、脳に特異的親和性を有する。また、リボ多糖でミクログリアを刺激するとインターロイキン-1 (IL-1) 及びインターロイキン-6 (IL-6) を産生する。また、インターフェロン- γ で刺激すると IL-5 を産生する。この性質は、IFN- γ で IL-5 を発現しないマクロファージと相違するものである。また、蛍光色素の取り込みを指標として貪飢能の試験を行った結果、本発明

の細胞株は、強い貪飢能を有する。本発明の株化ミクログリアは、アストロサイトよりも数百～数千倍もの貪飢能を有するものである。

(c) 細胞増殖性

培地から rGM-CSF を除去する実験を行うと増殖がみられなくなることから、本発明の株化ミクログリアは GM-CSF 依存的に増殖するものである。

本発明の株化ミクログリアの形態、特徴を第 1 ～ 4 図に具体例で例示する。

(3) 株化ミクログリアへの遺伝子の導入

本発明の株化ミクログリアに遺伝子を導入することは、遺伝子を脳に特異的に発現させるうえで必要である。目的とする遺伝子は、公知のクローニング手法により得ることができ、また、市販のものを使用することも可能であり、遺伝子の種類に特に限定されない。

例えば、遺伝子を株化ミクログリアに高率に導入する手法として DOTAP (ベーリンガーマンハイム社製) を用いる方法がある。すなわち、DOTAP を含む遺伝子導入用培地中で株化ミクログリアを目的遺伝子とともに培養する方法がある。培養は、CO₂インキュベーター中、37°Cで 16～24 時間培養したのち、ミクログリア培養用培地で rGM-CSF とともにさらに 30～72 時間、好ましくは 48 時間培養する。

なお、遺伝子をミクログリアに導入する方法としては、上記手法のほかに、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等の公知手法を用いることもできる。

ところで、導入遺伝子の安定発現株を分離する公知の方法で最も一般的に用いられる方法は、薬物耐性遺伝子を目的遺伝子と同時に細胞に導入して発現させ、染色体 DNA に取り込まれてその発現が安定的恒常的発現を行うようになった細胞以外を薬物処理により死にいたらしめ培養中から排除して分離する方法である。

このスクリーニング方法をミクログリアに適用した場合、安定的恒常的発現を行うようになったミクログリアが死細胞を認識して強い貪飢能を発現し、同時に活性化されて増殖能を失うことがある。このために、本発明の好ましい遺伝子の導入法としては、薬物耐性遺伝子の代わりに蛍光蛋白質、好ましくはミズクラゲ

由来のグリーン・フルオオレセント・プロテイン (green fluorescent protein (GFP)) を高等動物に発現できるように改変された発現ベクターを用いて、目的細胞を蛍光強度の差で安定的恒常的発現を行うミクログリアを分離する方法が挙げられる。

遺伝子が導入された細胞が脳に逆したか否かの確認、及び遺伝子の発現の確認は、導入細胞をあらかじめ食食細胞に特異的な蛍光色素で染色しておき、脳を摘出後凍結し、約 8 ミクロン厚の切片を作製し、蛍光顕微鏡下で蛍光をもつ細胞を同定するか、切片を、導入する遺伝子の基質により活性染色することにより行われる。

また、上記確認は磁気共鳴画像 (MRI)、ポジトロシ・エミッショントモグラフィー (PET) 等により行うことができる。例えば、MRI 用造影剤等を取り込ませた細胞を動物に注入してその動向を観察することもできる。これらの方によれば、動物を殺すことなく非侵襲的かつ簡単に観察することができる。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

実施例 1 株化ミクログリアクローンの分離

(1) ミクログリアの単離

新生マウス (C57BL/6, o/p/o/p) 及び新生ラット (Fisher) の脳を摘出し、氷冷したミクログリア培養培地 (Mi 培地という: Eagle's MEM, 10%ウシ血清、0.2%グルコース及び 5 μ g/ml ウシインシュリンを含む) 中で脳膜を剥離した。バスクールビベット又はナイロンメッシュで細胞を単細胞化し、上記 Mi 培地中で細胞を培養した。マウス脳については 20 ml の Mi 培地あたり脳 1 個分の細胞を、ラット脳については 40 ml の Mi 培地あたり脳 1 個分の細胞をそれぞれ 10 cm の培養皿 2 枚、10 cm の培養皿 4 枚中で培養した。培養は、CO₂ インキュベーター内 (5% CO₂, 95% 空気の条件) で、37°C で 10 ~ 14 日行った。なお、培地は 3 ~ 4 日毎に交換した。

明位相差像を示す細胞 (phase-bright round cell; P B R C) が出現した段階で、機械的振盪により P B R C を除去した後、200 U / ml トリプシン-0.02% EDTA で細胞をはがし、非コートプラスチック皿中、37°Cで30分インキュベートした。非コートプラスチック皿に接着した細胞を M i 培地で2回洗浄し、細胞を剥離させて回収した。同様の処理をさらに2回繰り返し、精製ミクログリアを得た。

(2) クローンの分離

上記(1)で得られた精製ミクログリア細胞を、10 cm シャーレに 1×10^6 個播種し、r GM-CSF (ジーンザイム (Genzyme) 社製) 存在下 M i 培地で7日間培養した。

細胞を回収した後計数し、限界希釈法によりクローンを分離した。すなわち、96穴プレート (ファルコン (Falcon) 社製) の各ウェルに、0.5 個 / ウェルの細胞濃度 (100 μl 中) で播種し、2 ng / ml のマウス遺伝子組換え型 GM-CSF (ジーンザイム (Genzyme) 社製) 存在下で約3週間培養した。各ウェルについてクローン化の有無を確認し、目的のクローンを分離した。

その結果、マウス脳由来のものについては5種類 (Ra2, GMI-M6-1, GMI-M6-3, GMI-M5-2, GMI-MF11)、ラット脳由来のものについては1種類 (GMI-R1) の株化ミクログリアが得られた。

このうち、株化ミクログリア Ra2 及び GMI-R1 は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に、Ra2 については「mouse microglia Ra2」と称し、FERM P-16109として、GMI-R1については「rat microglia GMI-R1」と称し、FERM P-16110としてそれぞれ寄託されている。

得られたクローンについてその性質を検討した。

(a) 形態

GMI-R1 を r GM-CSF 存在下及び非存在下で培養し、位相差顕微鏡で

観察した結果、rGM-CSF 存在下ではマクロファージ様ないし球状を呈し（第1図A）、rGM-CSF 非存在下では分枝状を示した（第1図B）。

（b-1）機能的特徴（脳親和性）

本発明の株化ミクログリアGM1-R1をプラスチックシャーレに付着させた状態にし、貪食細胞染色液（Diluent B：ザイナクシス（Zynaxis）社製）で調製した蛍光色素PKH26（ザイナクシス（Zynaxis）社製）と10%血清とを1:1で混合して上記シャーレに加え、37°Cで15分蛍光染色した（Ishihara, S., Sawada, M. et al., Exp. Neurol., 124, 219-230, 1993）。

細胞を回収し、 2×10^6 個を5週齢の同系（Fisher）ラット腋下動脈に注入した。注入して48時間後並びに1、2及び3週間後にラットの各臓器を摘出し、OCT（ティシュー・テック（Tissue Tek）社）溶液中で凍結した。

ミクログリアGM1-R1、及び比較として同系ラット（フィッシュ）の腹腔を冷PBSで洗浄することにより単離したマクロファージを、貪食細胞に特異的な蛍光色素で標識し、ラット腋下動脈に注入し、その組織配向性について組織切片を作製して検討した。

その結果、本発明の株化ミクログリアを注入した場合は正常脳に多くの蛍光細胞が見られたのに対し（第2図A）、肝臓には見られなかった（第2図B）。一方、マクロファージを注入した場合は、正常脳にはほとんど蛍光細胞が見られなかったのに対し（第2図C）、肝臓には多くの蛍光細胞が見られた（第2図D）。

従って、本発明の株化ミクログリアは、脳特異的な親和性を有するものであった。

（b-2）機能的特徴（IL-1及びIL-6産生能）

RA2細胞を 1×10^6 個を6cm培養皿に播き、リボポリ多糖で12時間刺激をしたもの、及び無刺激のものからRNAeasy（クイアジエン（Qiagene）社製）により総RNAを抽出し、そのうち $2 \mu\text{g}$ を用いて逆転写酵素（BR-L）を用いて混合cDNAを得た。このcDNAをテンプレートにして、以下の

配列を有する IL-1 特異的合成プライマー及び IL-6 特異的合成プライマーを用いて PCRを行った。

IL-1 特異的合成プライマー (Sawada et al., Int. J. Dev. Neurosci. 13, 253-264, 1995):

センス鎖: 5' - ATGGCAACTGTTCCGTGAACTCAACT - 3' (配列番号 1)

アンチセンス鎖: 5' - CAGGACAGGTATAGATTCTTCCTTT - 3' (配列番号 2)

IL-6 特異的合成プライマー (Sawada et al., Brain Res. 583, 296-299, 1992):

センス鎖: 5' - ATGAAGTTCCCTCTGCAAGAGACT - 3' (配列番号 3)

アンチセンス鎖: 5' - CACTAGGTTGCCGAGTAGATCTC - 3' (配列番号 4)

PCRは、55°Cを1分、72°Cを2分及び94°Cを1分の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行った (HYBAIDのOmnigeneを使用)。

PCR後、増幅産物をアガロースゲル電気泳動にかけて遺伝子の発現を調べた。その結果、リボ多糖により Ra 2 は IL-1 及び IL-6 発現を増大することがわかった (第3図、"LPS" のレーン)。なお、第3図において、Mは分子量マーカー、contは対照 (無刺激) を表す。

また、ELISAにより IL-1 及び IL-6 が産生されていることが確認された。さらに、本発明の株化ミクログリアのリボ多糖刺激後の培養上清を、IL-6 依存的に増殖する MH 60 細胞又は IL-1 依存的に増殖する D 10 細胞に添加培養して、MH 60 細胞及び D 10 細胞の増殖の有無を検討した。

その結果、いずれの細胞も、リボ多糖刺激をした本発明株化ミクログリアの培養上清存在下において増殖することがわかった。

(c) 細胞増殖性

5 × 10⁴ 個の GM1-R1 細胞を 96 穴テストプレートに播き、2 μg/ml の rGM-CSF を 1000 倍、5000 倍及び 10000 倍希釈となるように

それぞれ添加して4日間培養し、MTTアッセイを行った。対照としてヒトM-CSF(ミドリ十字)400u/mlを1000倍希釈したもの、又はPMA(ホルボルミリステートアセテート)0.1mg/mlを1000倍若しくは5000倍希釈したものを用いた(第4図A)。

一方、rGM-CSFを5000倍希釈したものと、各100u/mlのマウスIL-3、IL-4及びIL-6(いずれもジーンzyme(Genzyme)社)との比較試験を行った。各試薬をそれぞれ添加して2日後及び4日後のMTTアッセイを行った(第4図B)。

その結果、GMI-R1はrGM-CSFに依存して増殖することがわかった。

実施例2 本発明のミクログリアへの遺伝子の導入

大腸菌由来lacZ遺伝子発現ベクターptk β (クローンテック社(Clonetech)とDOTAPリビッド(ベーリンガー・マンハイム社(Boehringer-Mannheim))とを混合し、終濃度1 μ g/mlとした。これを血清を含む培地に混合して調製し、本発明の株化ミクログリアに添加して16時間処理した。対照として、遺伝子を導入しない株化ミクログリア、及び、実施例1と同様にして得られたマクロファージを用いた。

次に、通常の培地(EMEM: 10%FCSを含む)でさらに48時間培養し、実施例1(b-1)に記載の蛍光染色を行い、遺伝子が脳に移行し、発現するか否かの検討を行った。すなわち、成熟ラット(250~300g)をネンブターカル麻酔下、左腋下動脈を露出させ、止血処理後カニューレを挿入して1~2×10⁶個の細胞を注入した。注入後切開部を縫合し、ラットを回復させた。

次に、細胞注入後48時間でラットの脳を摘出し、連続した約8 μ mの3枚の凍結切片を作製し、それぞれ蛍光顕微鏡による観察を行った。また、 β -ガラクトシダーゼの活性染色及び活性の定量については以下のように行った。

上記3枚の切片のうちの1枚を0.5%グルタルアルデヒドで固定し、Liuらの方法(BioTechniques 7, 576-579, 1989)でXgalを基質として活性染色した。活性の定量は、切片1枚を100 μ lの溶解バッファーで超音波破碎によりホモゲナイズし、市販のキット(GalactoLight; Boehringer-Manheim)を用い

て測定した。

その結果、本発明の株化ミクログリアに遺伝子を導入した場合は、ラット脳の切片から λ acZ陽性細胞の存在が確認できた（第5図）。また、 β -ガラクトシダーゼ活性を化学発光法で定量した結果、大腸菌由来遺伝子 λ acZ発現ベクターを導入した株化ミクログリアを注入したラット脳切片において、遺伝子を導入しないものよりもはるかに高い活性が検出された（第6図）。

実施例3 本発明のミクログリアへの化学物質の導入及び脳への特異的導入

実施例1で使用した蛍光色素PKH26はダイリューエントB（diluent B）中で顆粒を作る。この顆粒を本発明のミクログリア細胞株は特異的に取り込んで細胞内に保持し、脳に移行するので、蛍光素PKH26を化学物質（抗癌剤）のモデルとして使用した。

その結果、本発明の株化ミクログリアを注入した場合は、正常脳に多くの蛍光細胞が見られたのに対し、肝臓には見られなかった。従って、本発明のミクログリアは化学物質（薬物）を脳特異的に運ぶといえる。

実施例4 GFPを用いた遺伝子導入法

1×10^6 個のGMI-R1細胞をシャーレにまきこみ、16時間後にGFP発現ベクターpEGFP 1.0 μ g（クロンテック（Clontech）社製）を遺伝子導入用培地に添加しこの培地に交換してCO₂インキュベーター中で細胞を37°Cで24時間培養した後、ミクログリア用の培地でrGM-CSFとともにさらに7日間培養した。

7日間培養した後、細胞を浮遊させ蛍光活性化細胞分画装置（fluorescent activated cell sorter, FACS, ベクトシーディックシン（Becton-Dickinson）社製FACS Calibur）で蛍光強度が遺伝子非導入細胞の100倍以上の細胞を分画して濃集し、さらにミクログリア用の培地でrGM-CSFとともに培養を継続した。

同様の操作を7日毎にさらに2回繰り返し、ほぼ90%以上の細胞が100倍程度の蛍光を持つ分画に回収できたので、これを細胞限界希釈法で1細胞/ウェ

ルの割合で T P 9 6 テストプレートにまきこみミクログリア用の培地で r G M - C S F とともにさらに培養した。これによって導入遺伝子 p E G F P を安定的恒常に発現するようになつたミクログリアを分離することができた。

いかにこの方法で分離できたか細胞の F A C S 分析結果の一例を図に示す。第 7 図は遺伝子が導入されていない細胞の F A C S 分析の結果であり、第 8 図は G F P 導入細胞の F A C S 分析の結果である。

産業上の利用可能性

本発明により、脳に特異的な親和性を有する株化ミクログリアが提供される。本発明の株化ミクログリアは、脳内に遺伝子を導入するためのキャリアー（担体）としてのみならず、薬物などの化学物質を脳特異的に導入するためのキャリアー（担体）としても有用である。

配列表

配列番号： 1

配列の長さ： 2 6

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸（合成 D N A ）

配列：

ATGGCAACTG TTCCCTGAACT CAACT

25

配列番号： 2

配列の長さ： 2 6

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸（合成 D N A ）

配列：

CAGGACAGGT ATAGATTCTT TCCTTT

26

配列番号：3

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ATGAAGTTCC TCTCTGCAAG AGACT

25

配列番号：4

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CACTAGGTTT GCCGAGTAGA TCTC

24

請求の範囲

1. 繙代培養の可能な株化ミクログリア。
2. 以下の性質を有する請求の範囲第1項記載の株化ミクログリア。
 - (a) 形態：顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子存在下においてマクロファージ様又は球状の形態、及び該因子非存在下において脳内に存在する分枝状ミクログリアに類似した分枝状の形態の二者又はいずれか一方の形態を有する。
 - (b) 機能的特徴：脳に特異的親和性を有する。
強い食食能を有する。
 - (c) 細胞増殖性：顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子に依存的に増殖する。
3. サイトカインの存在下にミクログリアから請求の範囲第1または2項記載の株化ミクログリアを分離する方法。
4. サイトカインがGM-CSFである請求の範囲第3項記載の方法。
5. GM-CSFが遺伝子組換え型である請求の範囲第4項記載の方法。
6. さらにIL-3及び/又は精製アストロサイト培養上清の存在下で行う請求の範囲第3～5項いずれかに記載の方法。
7. 請求の範囲第1又は2項に記載された株化ミクログリアからなる医薬用キャリアー。
8. 遺伝子又は薬物が導入された請求の範囲第1又は2項記載の株化ミクログリア。
9. 遺伝子が導入された請求の範囲第8項記載の株化ミクログリア。
10. 請求の範囲第8又は9項記載の株化ミクログリア、及び、製薬上の担体とからなる医薬組成物。
11. 脳疾患治療剤である請求の範囲第10項記載の医薬組成物。
12. 外来遺伝子及び蛍光蛋白質を発現する遺伝子を用いてミクログリアに遺伝子を導入し、蛍光蛋白質により遺伝子導入ミクログリアをスクリーニングする方法。

1'3. 蛍光蛋白質を発現する遺伝子がクラゲ由来のものである請求の範囲第1'2項記載の方法。

1'4. 外来遺伝子及び蛍光蛋白質を発現する遺伝子を用いてミクログリアに遺伝子を導入し、蛍光蛋白質により遺伝子導入ミクログリアを製造する方法。

1'5. 蛍光蛋白質を発現する遺伝子がクラゲ由来のものである請求の範囲第1'3又は1'4項記載の方法。

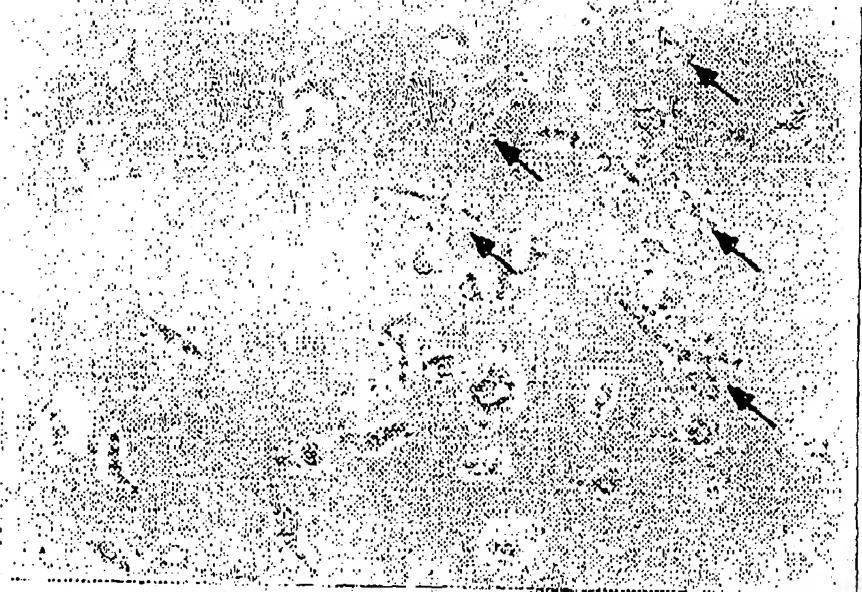
1'6. 請求の範囲第1'0又は1'1項記載の医薬組成物を用いて脳に特異的に薬物又は遺伝子を送達させてなる脳疾患の治療方法。

第図1

A

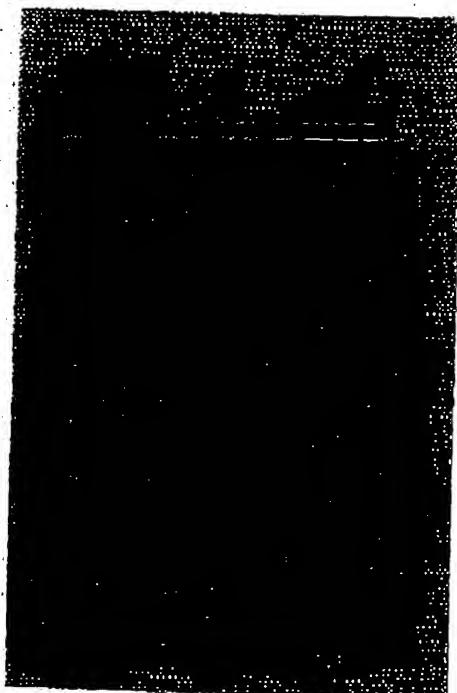
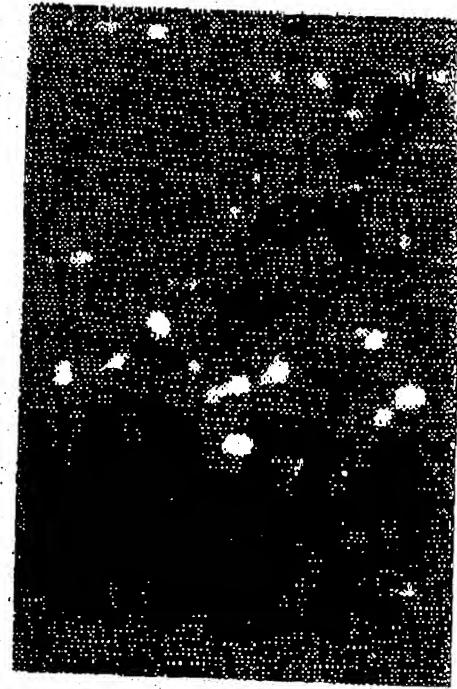
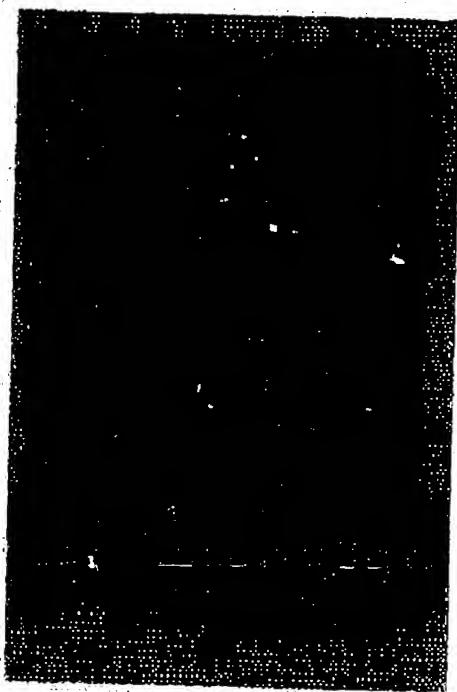
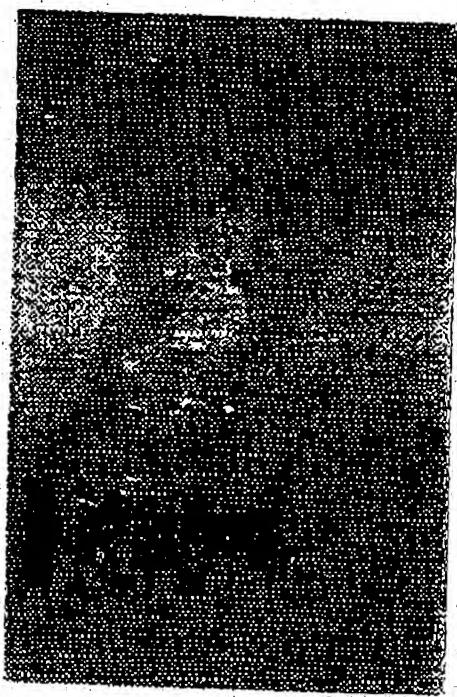


B



VVO 98/39448

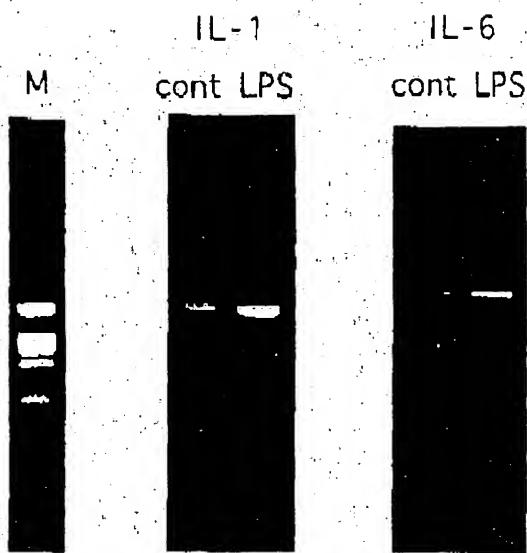
PCPA/PP98/00949



22

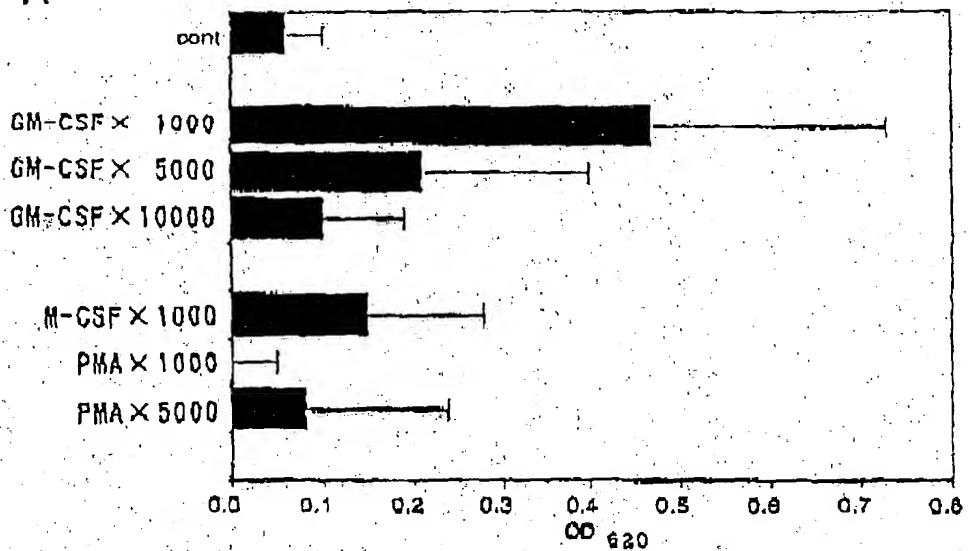
禁

第図3

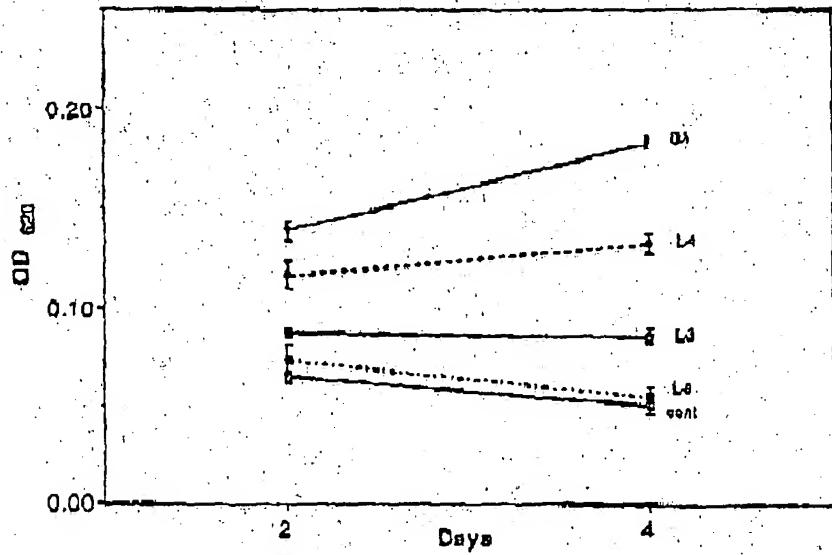


第 4 図

A



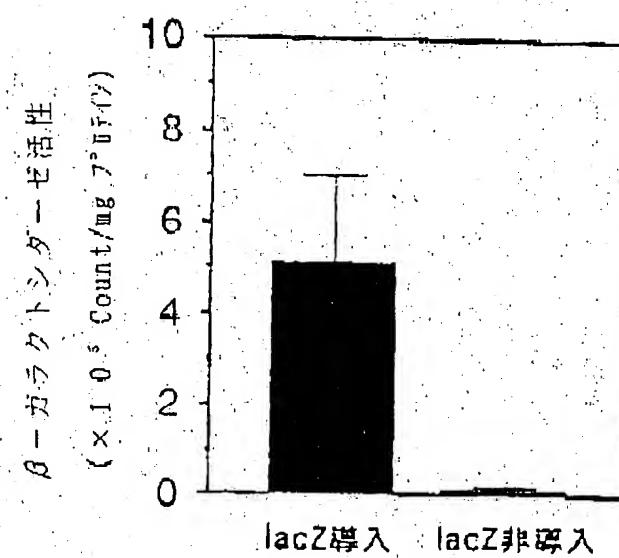
B



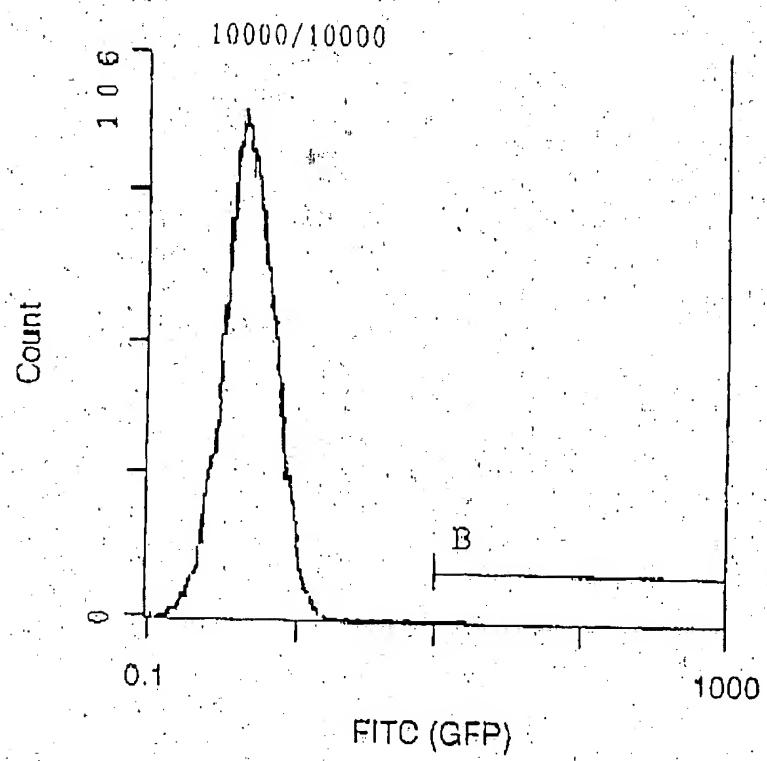
第図5



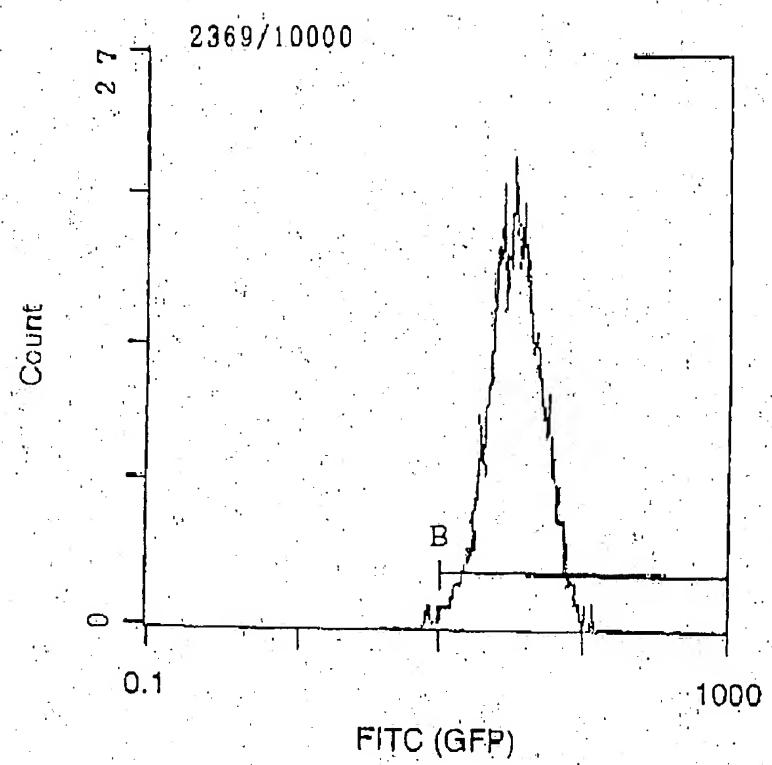
第 6 図



第 7 図



第 8 図



書式 7

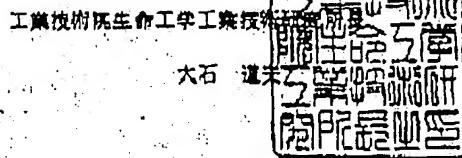
受 托 証

通知番号： 9 生寄文 第 335 号

通知年月日： 平成 9 年 3 月 4 日

科学技術振興事業団
代表者 中村 守翠

殿



1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別そのための表示)

mouse, mite, oil, Ruz

(受託番号)

FERM-LP-16109

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 様の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

■ 科学的性質

■ 分類学上の位置

3. 受領及び受託

当所は、平成 9 年 3 月 4 日に受領した 1 様の微生物を受託する。

様式 7



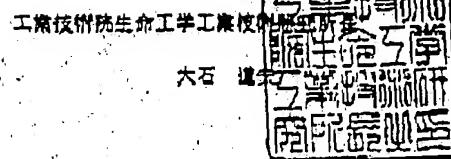
受 託 証

科学技術振興事業団
代表者 中村 守孝

殿

通知番号： 9 生研文 第 339 号

通知年月日： 平成 9 年 3 月 4 日



1. 微生物の表示	
(受託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
rat microglia: GM1-R1	FERM-P-16110
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 播の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<p>■ 科学的性質</p> <p>■ 分類学上の位置</p>	
3. 受領及び承諾	
当所は、平成 9 年 3 月 4 日に受領した1 播の微生物を受託する。	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00949

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N5/06, C12N5/10, C12N15/12, G01N33/48, A61K35/30, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N5/06, C12N5/10, C12N15/12, G01N33/48, A61K35/30, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JICST File (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 5-49473, A (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.); March 2, 1993 (02. 03. 93), Claims (Family: none)	1
X	Makoto Sawada et al., "Brain Selective Congenic Method with the use of Isolated Microglia and Established Microglia (in Japanese)", pages 704, 705, Bulletin of the Japanese Neurochemical Society, Vol. 35, No. 3 (1996)	1, 3, 7-11 2, 4-6, 12-15
X	Journal of Biological Chemistry, Vol. 271[27] (1996) L. Bitting et al., " β -Amyloid Peptide Secretion by a Microglial Cell Line is Induced by β -Amyloid-(25-35) and Lipopolysaccharide" p.16084-16089	1
X	Journal of Biological Chemistry, Vol. 270[13] (1995) U. Monning et al., "Extracellular Matrix Influences the Biogenesis of Amyloid Precursor Protein in Microglial Cells" p.7104-7110	1

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B"	earlier document but published on or after the International filing date	"X"	document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"I"	document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"C"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
May 12, 1998 (12. 05. 98)Date of mailing of the international search report
May 19, 1998 (19. 05. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00949

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Akio Suzumura et al., "Functional and Propagational Regulation of Cultured Microglia with the use of Colony Stimulating Factor (in Japanese)", pages 52, 53, Bulletin of the Japanese Neurochemical Society, Vol. 28, No. 1 (1989)	2, 4-6
Y	BioTechniques, Vol. 22[1] (1997-Jan) D.D. Mösser et al., "Use of a Dicistronic Expression Cassette Encoding the Green Fluorescent Protein for the Screening and Selection of Cells Expressing Inducible Gene Products" p.150-161	12-15
Y	Journal of Virological Methods Vol. 59 (1996) S. Eriksson et al., "Green fluorescent protein as a tool for screening recombinant baculoviruses" p.127-133	12-15
Y	Bio/Technology, Vol. 13 (1995) S. Delagrange et al., "Red-Shifted Excitation Mutants of the Green Fluorescent Protein" p.151-154	12-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00949

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 16

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claim 16 relates to a method for treatment of a human or animal body by therapy which does not require an international preliminary examination by the International Preliminary Examining authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39(iv).

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The subject matters of claims 1 to 10 and 16 relate to "subcultivable, established microglia." On the other hand, the subject matters of claims 11 to 15 relate to screening/preparation of cogenic microglia using a fluorescent protein.

In the inventions according to claims 11 to 15, use of the fluorescent protein in the cogenic microglia forms a novel inventive concept. The "fluorescent protein" and the "cogenic microglia", however, are not constituent features of the inventions according to claims 1 to 10 and 16. As is apparent from the documents cited in the present search report and the description of the specification, the microglia per se is well known.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00949

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

in the art before the present application. Therefore, there is no united, novel, inventive concept common to all of claims 1 to 16.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(I.P.C.))

Int.Cl* C12N5/06, C12N5/10, C12N15/12, G01N33/48
A61K35/30, A61K48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(I.P.C.))

Int.Cl* C12N5/06, C12N5/10, C12N15/12, G01N33/48
A61K35/30, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JICSTファイル (JICST)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ--*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 5-49473, A (持田製薬株式会社) 2. 3月, 1993 (02, 03, 93) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1
X Y	神経化学, 第35巻第3号 (1996) 濱田 誠 他 「單離ミクログリアおよび株化ミクログリアを用いた脳選択的遺 伝子導入法」p. 704-705	1, 3, 7-11 2, 4-6, 12-15
X	Journal of Biological Chemistry, Vol. 271[27] (1996) L.Bitting <i>et al.</i> 「 β -Amyloid Peptide Secretion by a Microglial Cell Line」	1

[X] C欄の続きにも文献が列挙されている。

 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「I」優先権主張に疑惑を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」は頭による明示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 12. 05. 98	国際調査報告の発送日 1905.98
国際調査機関の名称及びて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 上條 錠 電話番号 03-3581-1101 内線 3449 4月 9463

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
	is Induced by β -Amyloid-(25-35) and Lipopolysaccharide] p. 16084-16089	
X	Journal of Biological Chemistry, Vol. 270[13] (1995) U. Monning <i>et al.</i> [Extracellular Matrix Influences the Biogenesis of Amyloid Precursor Protein in Microglial Cells] p. 7104-7110	1
Y	神経化学, 第28巻第1号 (1989) 錫村明生 他 [Colony Stimulating Factorによる培養ミクログリアの機能および増殖の調節] p. 52-53	2, 4-6
Y	BioTechniques, Vol. 22[1] (1997-Jan) D. D. Mosser <i>et al.</i> [Use of a Dicistronic Expression Cassette Encoding the Green Fluorescent Protein for the Screening and Selection of Cells Expressing Inducible Gene Products] p. 150-161	12-15
Y	Journal of Virological Methods Vol. 59 (1996) S. Eriksson <i>et al.</i> [Green fluorescent protein as a tool for screening recombinant baculoviruses] p. 127-133	12-15
Y	Bio/Technology, Vol. 13 (1995) S. Delagrange <i>et al.</i> [Red-Shifted Excitation Mutants of the Green Fluorescent Protein] p. 151-154	12-15

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

注第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 1'6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 1'6 は治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 は、有意味な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-10, 1'6 は「継代培養の可能な株化ミクログリア」に関するものであり、請求の範囲 1'1-1'5 は蛍光蛋白質により遺伝子導入ミクログリアをスクリーニング・製造するものである。

請求の範囲 1'1-1'5 に係る発明は遺伝子導入ミクログリアに蛍光蛋白質を用いることが新規な発明概念となるものであると認められる。しかし、請求の範囲 1-10, 1'6 に係る発明は「蛍光蛋白質」、「遺伝子導入ミクログリア」を構成要件とするものでなく、本調査報告において引用された文献及び明細書中の記載から明らかのように、ミクログリアそのものは本出願前周知のものであるから、請求の範囲 1-1'6 全てに共通する統一的で新規な発明概念が存在しない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の中立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

特許協力条約に基づく国出願

願書

山願人は、この国出願を出願のための登録登録手続を
統一に従って処理されることを請求する。

出願人登録番号	出願人登録番号
(受付印)	
出願人又は代理人の登録記号 (初回する場合、最大12字)	J A 9 0 6 0 1 1

第Ⅳ欄 発明の名称

株化ミクログリア

第Ⅳ欄 山願人

氏名(名称)及びあて名(姓・名の前に記載)法人は公式の完全な名称を記載(あて名は郵便番号及び店名も記載)

科学技術振興事業団

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-ken

332-0012 JAPAN

この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての山願人である:

すべての指定国 米国を除くすべての指定国 米国のみ 他の記載に記載した指定国

第Ⅳ欄 ものの山願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名(姓・名の前に記載)法人は公式の完全な名称を記載(あて名は郵便番号及び店名も記載)

この欄に記載した者は
次に該当する:

山願人のみである。

山願人及び発明者である。

発明者のみである。
(この欄に記入しないときは)
(は以下の記入しないときは)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての山願人である:

すべての指定国 米国を除くすべての指定国 米国のみ 他の記載に記載した指定国

その他の山願人又は発明者が他欄に記載されている。

第Ⅳ欄 代理人又は担当者の代號番号 地域のあて名

次に記載された者は、出願期間において山願人のため行動する:

代理人

共通の代表者

氏名(名称)及びあて名(姓・名の前に記載)法人は公式の完全な名称を記載(あて名は郵便番号及び店名も記載)

電話番号:

10266弁理士 佐伯憲生 SAEKI Norio

03-5688-5136

〒110-0016 日本国東京都台東区台東一丁目30番9号

ファクシミリ番号:

第2ツチヤビル 9階

03-5688-5137

9th Floor, 2nd-Tsuchiya Bldg., 30-9, Taito 1-chome,
Taito-ku, Tokyo 110-0016 JAPAN

加入電話番号:

第V編 國の指定

規則 4.9(1)の規定に沿つて次の指査を行う(候當する)アドバイスを付すこと。
少なくとも!つのアドバイスを付すこと)。

尼域學會

A P **アリポ特許** : **G H** ガーナ Ghana, **K E** ケニア Kenya, **L S** レソト Lesotho, **M W** マラウイ Malawi, **S D** スーダン Sudan, **S Z** ス威士蘭 Swaziland, **U G** ウガンダ Uganda, **Z W** ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラブロコルと特許協力条約の締約国である他の国

E A **ユーラシア特許** : **A M** アルメニア Armenia, **A Z** アゼルバイジャン Azerbaijan, **B Y** ベラルーシ Belarus, **K G** キルギスstan Kyrgyzstan, **K Z** カザフstan Kazakhstan, **M D** モルドバ Republic of Moldova, **R U** ロシア連邦 Russian Federation, **T J** タジキスタン Tajikistan, **T M** トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国

E P **ヨーロッパ特許** : **A T** オーストリア Austria, **B E** ベルギー Belgium, **C H** チュニス及びリヒテンシャウゼン Switzerland and Liechtenstein, **D E** ドイツ Germany, **D K** デンマーク Denmark, **E S** スペイン Spain, **F I** フィンランド Finland, **F R** フランス France, **G B** 英国 United Kingdom, **G R** ギリシャ Greece, **I E** アイルランド Ireland, **I T** イタリア Italy, **L U** ルクセンブルク Luxembourg, **M C** モナコ Monaco, **N L** オランダ Netherlands, **P T** ポルトガル Portugal, **S D** スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国

O A **OAPI特許** : **B P** ブルキナ・ファソ Burkina Faso, **B J** ベニン Benin, **C F** 中央アフリカ Central African Republic, **C G** コンゴ Congo, **C I** ボトスナ Côte d'Ivoire, **C M** カメルーン Cameroon, **G A** ガボン Gabon, **G N** ガニア Guinea, **M L** マリ Mali, **M R** モーリタニア Mauritania, **N E** ニジェール Niger, **S N** セネガル Senegal, **T D** チャド Chad, **T G** トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機関と特許協力条約の締約国である他の国 (他の機関の依頼又は取扱いを求める場合には点線に記入) 他

■国内特許（他の機器の操作又は飛行機を操縦する場合には飛行機上に用意する）

<input type="checkbox"/> A L アルバニア Albania	<input type="checkbox"/> M G マダガスカル Madagascar
<input type="checkbox"/> A M アルメニア Armenia	<input type="checkbox"/> M K マケドニア旧ユーゴスラビア The former Yugoslav Republic of Macedonia
<input type="checkbox"/> A T オーストリア Austria	<input type="checkbox"/> M N モンゴル Mongolia
<input type="checkbox"/> A U オーストラリア Australia	<input type="checkbox"/> M W マラウイ Malawi
<input type="checkbox"/> A Z アゼルバイジャン Azerbaijan	<input type="checkbox"/> M X メキシコ Mexico
<input type="checkbox"/> B A ボスニア・ヘルツェゴビナ Bosnia and Herzegovina	<input type="checkbox"/> N O ノルウェー Norway
<input type="checkbox"/> B B バルバドス Barbados	<input type="checkbox"/> N Z ニュージーランド New Zealand
<input type="checkbox"/> B C ブルガリア Bulgaria	<input type="checkbox"/> P L ポーランド Poland
<input type="checkbox"/> B R ブラジル Brazil	<input type="checkbox"/> P T ポルトガル Portugal
<input type="checkbox"/> B Y ベラルーシ Belarus	<input type="checkbox"/> R O ルーマニア Romania
<input type="checkbox"/> C A カナダ Canada	<input type="checkbox"/> R U ロシア連邦 Russian Federation
<input type="checkbox"/> C H and L I スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein	<input type="checkbox"/> S D スーダン Sudan
<input type="checkbox"/> C N 中国 China	<input type="checkbox"/> S E スウェーデン Sweden
<input type="checkbox"/> C U キューバ Cuba	<input type="checkbox"/> S G シンガポール Singapore
<input type="checkbox"/> C Z チェコ Czech Republic	<input type="checkbox"/> S I スロヴェニア Slovenia
<input type="checkbox"/> D E ドイツ Germany	<input type="checkbox"/> S K スロ伐キア Slovakia
<input type="checkbox"/> D K デンマーク Denmark	<input type="checkbox"/> S L シエラレオネ Sierra Leone
<input type="checkbox"/> E E エストニア Estonia	<input type="checkbox"/> T J タジキスタン Tajikistan
<input type="checkbox"/> E S スペイン Spain	<input type="checkbox"/> T M トルクメニスタン Turkmenistan
<input type="checkbox"/> F I フィンランド Finland	<input type="checkbox"/> T R トルコ Turkey
<input type="checkbox"/> G B イギリス United Kingdom	<input type="checkbox"/> T T トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago
<input type="checkbox"/> G E グルジア Georgia	<input type="checkbox"/> U A ウクライナ Ukraine
<input type="checkbox"/> G H ガーナ Ghana	<input type="checkbox"/> U G ウガンダ Uganda
<input type="checkbox"/> H U ハンガリー Hungary	<input checked="" type="checkbox"/> U S 米国 United States of America
<input type="checkbox"/> I L イスラエル Israel	<input type="checkbox"/> U Z ウズベキスタン Uzbekistan
<input type="checkbox"/> I S アイスランド Iceland	<input type="checkbox"/> V N ベトナム Viet Nam
<input checked="" type="checkbox"/> J P 日本 Japan	<input type="checkbox"/> Y U ユーゴスラビア Yugoslavia
<input type="checkbox"/> K E ケニア Kenya	<input type="checkbox"/> Z W ジンバブエ Zimbabwe
<input type="checkbox"/> K G キルギスタン Kyrgyzstan	
<input type="checkbox"/> K R 韓国 Republic of Korea	
<input type="checkbox"/> K Z カザフスタン Kazakhstan	
<input type="checkbox"/> L C セントルシア Saint Lucia	
<input type="checkbox"/> L K スリランカ Sri Lanka	
<input type="checkbox"/> L R リベリア Liberia	
<input type="checkbox"/> L S レソト Lesotho	
<input type="checkbox"/> L T リトアニア Lithuania	
<input type="checkbox"/> L U ルクセンブルグ Luxembourg	
<input type="checkbox"/> L V ラトヴィア Latvia	
<input type="checkbox"/> M D モルドバ Republic of Moldova	

出勘人は、上記の指定に加えて、規則 4. 9 (b) の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる全ての國の指定を行う。ただし、

他の優先権の山附（先の山附）が追配権に記載されている

下記の先の山附に沿づき優先権を主張する

固有名 (その固において又はその固 について先の山附がされた)	先の山附の出附日 (日、月、年)	先の山附の山附番号	先の山附を受取した官署名 (広域山附又は国際山 附の場合のみ記入)
(1) 日本国 JAPAN	05.03.97	平成9年特許願 第60448号	
(2)			
(3)			

先の出附の認証標本が、本件の国際山附の実際のもの（日本国外刊行）で見付される場合であって、優先権登録付請求書を本件の国際山附に添付するときは、次の□に
印を付すこと。

本件の国際山附の登録用紙の書類のうちを、登録用紙（日本国外刊行の箇所）に対して添付している。

第Ⅶ回 判明（国際山附の記載事項）

国際山附の登録用紙（ISA/JP）の選択欄 I S A / J P
分類登録用紙、上記国際山附の登録用紙による別の原本（国際・国際型又はその他）が既に実施又は請求されており、重複な限り当該請求の結果が今回の国際山附の部
分とすることを請求する場合に記入する。先の請求に関連する出附（詳しくはその説明）又は関連する請求結果を表示することにより、当該先の請求又は請求を特記
する。

登録用紙（又は広域官署）

出附日（日、月、年）

出附番号

第Ⅷ回 判明（合計用紙）

この国際山附の用紙の枚数は次のとおりである。

1. 附書	3枚
2. 明細書	15枚
3. 請求の範囲	2枚
4. 要約書	1枚
5. 図面	8枚
合計	29枚

この国際山附には、以下にチェックした書類が添付されている。

1. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された要約書	6. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙
2. <input type="checkbox"/> 包括要件の算定	7. <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書類
3. <input type="checkbox"/> 記名押印（署名）の説明書	8. <input checked="" type="checkbox"/> 國際事務局の回復への添込みを証明する書類
4. <input type="checkbox"/> 優先権書類（上記用紙の （）の番号を記載する）	9. <input checked="" type="checkbox"/> 布託した微生物に関する書類
	10. <input type="checkbox"/> ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列リスト (フレオジナルティスク)
	11. <input type="checkbox"/> その他（例えば、優先権登録付請求と具体的に 関連する）

契約用とともに公表する回として 第 回を提示する（図面がある場合）

IX回 判明（登録用紙の登記名押印用紙）

各入の氏名（名跡）を記載し、その次に押印する。

佐伯 慶生



1. 国際山附として提出された書類の実際の受理の日

2. 国際山附の登録用紙

3. 国際山附として提出された書類を削除する書類又は図面であって

2. 図面

 受理された

その後期間内に提出されたもの実際の受理の日（訂正日）

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の別添内の受理の日

 不足図面がある5. 山附人により特定された
国際検査機関

I S A / J P

6. 調査手数料未払いにつき、別添書を機関に
押充用紙を送付していない

III回 判明（登録用紙）

記録原本の受理の日

この用紙は、国際山附の一郎を構成せず、国際山附の用紙の枚数に算入しない。

P C T

姓 父 氏名 月日 年月 系氏
附 附 附 附

出願人又は代理人の用紙記号

J A 9 0 6 0 1 1

受理官印

国際山附番号

受理官印の日付印

出願人

科学技術振興事業団

月次定の手数料料の目録

1. 及び2. 特許協力条約に基づく国際山附料に関する法律(国内法)
第18条第1項第1号の規定による手数料(注1)
(送付手数料(T)及び調査手数料(S)の合計)

95,000 円 T+S

国際手数料(注2)

基本手数料

国際山附に含まれる用紙の枚数 29 枚

最初の3.0枚まで

55,000	円	b1
0	円	b2

3.0枚を超える用紙の枚数 用紙1枚の手数料

b1及びb2に記入した金額を加算し、合計額をbに記入

55,000	円	b
--------	---	---

指定期数料

国際山附に含まれる指定期数(注3) 3

3 × 12,700

38,100	円	d
--------	---	---

支払うべき指定期数料の数(上記は1つ)
(注4)

3及びdに記入した金額を加算し、合計額をeに記入

93,100	円	e
--------	---	---

4. 納付すべき手数料の合計

T+S及びeに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

188,100	円	合
---------	---	---

(注1) 送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許用紙をもって納付しなければならない。

(注2) 国際手数料については、受理官署である日本特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込みを證明する書類を提出することにより納付しなければならない。

(注3) 初回請求でレ印を付した□の数。

(注4) 指定期を記入する。ただし、11指定期以上は一律1とする。



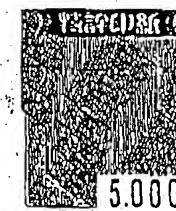
50.000円



30.000円



10.000円



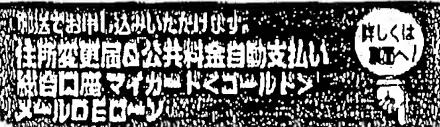
5.000円

送付手数料・調査手数料 95,000円

ご利用明細

本日はご来店いただきありがとうございます。

年月日	時刻	取扱店番	銀行番号支店番号	口座番号	印紙税印替納付につき臨時税務署承認済
100305	13:19:12				
お取扱内容	お取引金額	お預け金額	おつり	お取扱金額	
お振込	×93,100		×17,201	17,201	
ご案内				50円 100円 60円 10円 5円	10
お受取人 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 02173286 WIPO-PCT GENEVA機 ご依頼人 サエキ ノリオ機 03-5688-5136 税込手数料 263円を いたしました					



●残高振の金額は次回余振込の証券類を含んでいます。
 ●残高の頭部に「-」がある場合は、お借入残高を表わします。

◎ 東京三菱銀行



基本手数料 55,000円
 指定手数料 38,100円
 合 計 93,100円



受 托 証

通知番号：9生寄文第338号

通知年月日：平成9年3月4日

科学技術振興事業団
代表者：中村 守孝

股

工業技術院生命工学工業技術研究所

大石 道夫



1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

mouse, microglia, Riz

(受託番号)

FERM P-16109

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

■ 科学的性質

■ 分類学上の位置

3. 受取及び受託

当所は、平成9年3月4日に受領した1欄の微生物を受託する。

受 托 証

通知番号： 9 生奇文 第 339 号

通知年月日： 平成 9 年 3 月 4 日

科学技術振興事業団
代表者 中村 守

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所

大石 道夫



1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

rat microglia GMI-R1

(受託番号)

FERM P-16110

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 様の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

■ 科学的性質

■ 分類学上の位置

3. 受領及び受託

当所は、平成 9 年 3 月 4 日に受領した 1 様の微生物を受託する。